

Attorney Docket No. 4220-122 US

The undersigned certifies that this communication is being deposited with the United States Postal Service as prepaid first class mail in an envelope addressed to Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on December 5, 2003.

Diane Dunn McKay

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of
PARK et al.

Serial No. 10/656,496

Group Art Unit: 1617

Filed: September 5, 2003

Examiner: Not yet assigned

Title: METHOD FOR PREPARING
TRICHOLOMA MATSUTAKE-INFECTED
YOUNG PINE TREE ...

X

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Dear Sir:

Enclosed is a copy of Korean Priority Document No. 2002-53759 for the above-described application. Accordingly, the claim for priority under 35 U.S.C. § 119 is satisfied.

It is believed that no fee is required. If any additional fees are required, the Commissioner is authorized to charge Deposit Account No. 13-2165.

Respectfully submitted,

Dated: December 5, 2003

Diane Dunn McKay

Reg. No. 34,586

Attorney for Applicant

MATHEWS, COLLINS, SHEPHERD & McKAY, P.A.
100 Thanet Circle, Suite 306
Princeton, NJ 08540
Tel: 609 924 8555
Fax: 609 924 3036



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0053759
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 09월 06일
Date of Application SEP 06, 2002

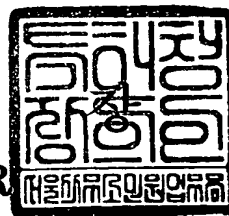
출원인 : 경상북도지사
Applicant(s)



2003 년 08 월 22 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.09.05
【발명의 명칭】	송이 균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양에 의한 소나무 송이균 감염묘 형성방법
【발명의 영문명칭】	Method for producing mycellia-infected young pine by coculturing Tricholoma matsutake and aseptic seedling of pine
【출원인】	
【명칭】	경상북도 산림환경연구소
【출원인코드】	2-1999-046729-2
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	2002-068841-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박무창
【성명의 영문표기】	PARK, Moo Chang
【주민등록번호】	470206-1703116
【우편번호】	706-777
【주소】	대구광역시 수성구 수성4가 1090-6 수성보성타운 107동 1103호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	심상갑
【성명의 영문표기】	SIM, Sang Gab
【주민등록번호】	580130-1691622
【우편번호】	780-751
【주소】	경상북도 경주시 동천동 937 동원맨션 나동 601호
【국적】	KR

【발명자】**【성명의 국문표기】** 천우재**【성명의 영문표기】** CHEON, Woo Jae**【주민등록번호】** 720124-1711018**【우편번호】** 790-755**【주소】** 경상북도 포항시 남구 연일읍 유강리 유강우방타운 101동 206호**【국적】** KR**【심사청구】** 청구**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이덕록 (인)**【수수료】****【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 10 면 10,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 5 항 269,000 원**【합계】** 308,000 원**【감면사유】** 정부출연연구기관**【감면후 수수료】** 154,000 원

【요약서】**【요약】**

본 발명은 송이균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양에 의한 소나무 송이균 감염묘 형성방법에 관한 것으로, 본 발명은 멸균한 배양용기 내에 PDB(Potato Dextrose Broth Difco.)배지에서 액체배양한 자연산 송이버섯의 자실체에서 분리된 송이균주 KBFERI 20T05를 접종하고, 그 위에 펄라이트, 스펀지 폼 피트모스의 혼합 상토와 K-액체 배지를 분주하고, 소나무 종자를 무균 발아시켜 얻은 무균 발아묘를 상기 혼합 상토에 치상한 다음, 상기 송이균주와 공동 배양하여 소나무 유묘의 세균에 송이 균근이 형성하도록 하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명은 종래의 송이균주와 분자생물학적으로 상동한 송이균을 사용함으로써 실제 감염원을 객관적으로 알 수 있는 효과가 있고, 기내 배양방법에 의해 연중 감염된 묘목의 대량생산이 가능한 효과가 있다.

【대표도】

도 6

【색인어】

송이버섯, 고체배지, 액체배지, 혼합상토, 균막, 소나무 무균 발아묘, 송이균주, 감염묘, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)

【명세서】**【발명의 명칭】**

송이 균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양에 의한 소나무 송이균 감염묘 형성방법
{Method for producing mycellia-infected young pine by coculturing Tricholoma
matsutake and aseptic seedling of pine}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 자연산 송이버섯에서 분리한 송이 균주 KBFERI 20T05의 액체배양 사진도이다.

도 2는 무균 발아된 소나무 유묘의 사진도이다.

도 3은 종이컵이 삽입된 형태의 제작 배양용기의 사진도이다.

도 4는 송이균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양을 위한 감염배지의 구성 및 사진도이다.

도 5는 송이 균주의 균사체가 감염된 소나무 유묘의 사진도이다.

도 6은 균근을 형성한 소나무 감염묘 세근의 실체현미경 사진도이다.

도 7은 소나무 유묘의 세근에 침입한 균사의 광학현미경 사진도이다.

도 8은 소나무 유묘의 세근에 침입한 균사의 형광현미경 사진도이다.

도 9는 감염된 소나무 묘목의 세근을 절취한 단편에서 PDA 고체배지 상에서 생장하는 송이균 균사체의 사진도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<10> 본 발명은 송이 균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양에 의한 소나무 송이균 감염묘 형성방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명은 무균 소나무 발아묘와 송이 균사체를 공동 배양하여 소나무묘목 뿌리에 송이균 만을 선택하여 감염시키는 방법에 관한 것이다.

<11> 송이버섯(*Tricholoma matsutake*)은 담자균아문(*Basidiomycotina*) 주름버섯목(*Agaricales*) 송이버섯과(*Tricholomataceae*)에 속하는 균류로서 소나무, 눈잣나무, 솔송나무, 가문비나무 등 침엽수 군락주변에서 채집되며 우리나라에서는 소나무군락에서만 발생한다고 알려져 있다. 송이버섯은 일본과 한국 사람들이 선호하는 식용버섯으로서 특히 동해안 지역의 중요한 농가 소득원이다. 송이버섯은 그만의 독특한 향취를 내는데 향취물질로 1-옥텐-3-올(1-octen-3-ol), 2-옥타놀(2-octanol), 1-옥텐(1-octene) 및 4-메틸 신나메이트(4-methyl cinnamate)가 있다. 송이버섯은 주로 소나무(적송)의 가는 뿌리에 공생하는 활물기생균으로서 외생균을 만들어 공생하는 버섯으로 알려져 있는데 아직 인공적인 자실체 형성에 대한 보고는 없다. 오가와(1973)등은 산지의 균환 주위에 소나무 묘목을 천식하는 기외 송이균 감염묘를 생산하는 연구를 실시하였으나, 성공률은 높지 않았다. 또한, 이바라키현 산림연구소(1999)는 기내 감염묘 형성에 성공한 바 있다.

<12> 즉, 송이버섯은 활물기생균이므로 인위적으로는 자실체(버섯)형성이 이루어지기 힘들어 인공재배가 이루어진 사례가 없었고, 이러한 이유로 종래의 송이재배기술은 단지, 송이버섯이 발생하는 산지에서 송이발생환경인자(습도, 임내비음도, 온도 등)를 충족시키기 위해 관수, 저온 터널설치, 낙엽 굵기, 컵 씌우기 등의 인위적인 방법을 통해 송이의 생산량을 증대시키는 등의 일련의 야외작업이 이루어져 왔다. 이러한 방법을 통해 어느 정도 송이버섯을 증수할 수 있었으나, 송이버섯이 생산되는 산지에만 국한될 뿐이었다. 따라서, 송이의 증수를 위한 간접적 접근방법이 아니라, 구체적인 방법으로써 송이 균사체 배양 후 균사체를 송이발생산지에 살포하여 균사체 덩어리를 토양에 넣는 방법이나 송이버섯 자실체에서 포자를 회수하여 산지에 살포하는 방법, 균사체가 살아있는 상태의 토양을 송이버섯이 발생되지 않는 산지에 이식하는 방법을 사용하였으나 균사의 생장속도가 다른 세균 및 진균보다 늦은 송이균의 특성 때문에 세력을 잃어버리는 결과를 야기하였고 강우와 토양상태 등에 따라 소나무뿌리에 감염되지 않고 유실됨으로써 송이증수를 위한 실질적인 효과는 볼 수 없었다.

<13> 또한, 야외에서 송이버섯을 발생하는 소나무 주위에 형성된 송이균 환에 어린 소나무 묘목을 천식하여 수 년 동안 묘목을 생장시키고 이 묘목을 다시 송이버섯 비 발생산지에 이식하는 방법이 있으나, 상기 방법 역시 송이균사가 소나무뿌리에 감염되기 전에 야외의 수많은 다른 유사 균류에 의해 감염되고 활착되는데 어려움이 있고, 묘목에 감염된 균이 송이균인지 그 여부를 확인할 방법이 없었으며, 또한 많은 수의 묘목을 생산하지 못한다는 단점이 있다.

<14> 따라서, 본 발명의 발명자는 송이 균사체가 소나무 뿌리 내로 침입하여 공·기생함에 착안하여 기내배양을 통해 무균 소나무 발아묘와 송이균사체를 공동 배양하여 소나무

묘목 뿌리에 송이균 만을 선택적으로 감염시켜 소나무 송이균 감염묘를 대량생산하는 방법을 제공하고자 한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<15> 본 발명의 상기 목적은 멸균한 배양용기 내에 PDB(Potato Dextrose Broth, Difco사 제품)배지에서 액체배양한 자연산 송이버섯의 자실체에서 분리된 송이균주 KBFERI 20T05를 접종하고, 그 위에 펄라이트와 스펀지 폼 피트모스의 혼합상토와 K-액체배지를 분주하고, 소나무종자를 무균 발아시켜 얻은 무균 발아묘를 상기 혼합상토에 치상한 다음 상기 송이균주와 공동 배양하여 소나무 유묘의 세균에 송이 균근이 형성하도록 함으로써 달성하였다.

<16> 이하, 본 발명의 구체적인 구성을 상세히 설명한다.

【발명의 구성 및 작용】

<17> 본 발명은 소나무 유묘와 송이균주의 자실체를 공동 배양하여 송이균 만이 감염된 소나무 감염묘를 형성하는 것에 관한 것으로, 감염배지를 위한 배양용기의 제작, 송이균주 KBFERI 20T05의 자실체를 감염배지에 접종, 소나무 발아묘의 성장을 위한 혼합상토와 K-액체배지의 제조, 소나무 발아묘를 상기 감염배지에 치상하는 단계로 구성된다.

<18> 본 발명은 송이균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양에 의한 소나무 송이균 감염묘를 형성하는 방법에 관한 것으로, PDB 배지에서 액체배양한 송이균주 자실체를 분쇄하여 얻은 균사체 분쇄물을 멸균수 1 mL 당 건조중량 0.010 ~ 0.020 mg으로 하여 살균된 배양용기 바닥에 접종하는 단계; 펄라이트와 스펀지 폼 피트모스를 80 : 1 ~ 2의 비율로 섞어 제조한 혼합상토를 상기 송이균주 균사체 분쇄물 위에 붓는

단계; K-액체배지 총량 1L를 기준으로 하여 NH_4NO_3 1.65 g, KNO_3 0.2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002g, KCl 0.02g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.2g, $\text{NH}_4\text{-Tar}$ 0.5g, Fe-Cit 0.5ml, H_3BO_3 0.031g, $\text{MnSO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01516g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0086g, KI 0.00083g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00025g, Thiamine HCl 100 μg , 맥아추출물 1.0g, 효모추출물 0.5g, 카제인 0.3g 및 포도당 3.0g 의 비율로 첨가하고 나머지는 정제수로 채워 넣어 pH 5.5 ~ 5.6 이 되도록 제조된 K-액체배지를 상기 혼합상토 위에 분주하는 단계; 소나무 종자를 무균 발아하여 얻은 길이가 3 cm 인 무균 발아묘를 상기 혼합상토와 K-액체배지를 포함한 감염배지 위에 치상하고 배양용기의 뚜껑을 닫는 단계; 상기 단계에 의하여 제조된 소나무 유묘와 송이균 배양체를 15 ~ 25℃, 24시간 10 ~ 40,000 lux 의 광 조건 하에서 공동 배양하는 단계로 구성된다.

<19> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 단계별로 설명한다.

<20> 제 1단계: 감염배지를 위한 배양용기의 제작 및 살균 단계

<21> 소나무 유묘와 송이균을 공동배양하기 위한 감염배지를 포함하는 배양용기를 제작하고 121℃, 20분간, 1.2기압 하에서 고온 살균한다. 상기 배양용기는 살균과정동안 변형이나 용해가 없는 재질로 제작되어야 하며, 배양과정 동안 다른 미생물의 감염으로부터 안전해야 한다.

<22> 한편, 실제로 생분해되는 배양용기를 사용하는 것이 바람직하지만, 산지에 감염묘를 이식 할 경우 배양용기 채로 이식을 하면 배양용기는 생분해에 오랜 시간 걸리므로 가급적 배양과 이식을 고려한 배양용기를 사용하여야 한다. 이점을 고려

하여 본 발명은 배양용기에 종이컵을 끼운 채로 배양한 다음 이식 시 종이컵만을 분리하여 산지에 이식하는 방법을 선택하였다. 따라서, 바람직하게는 상기 배양용기는 하단은 시중에 판매하는 종이컵(소주컵)을 배양용기에 밀착하여 끼워 넣고 상단은 종이컵이 없는 투명한 빈 뚜껑을 덮어 도 3의 형태로 배양용기를 제작하여 고온 살균한다. 상기 종이컵은 배양물 성장에 거의 영향을 주지 않으며, 살균과 배양동안 다소 외형의 변화는 있지만 배양 전 기간 내내 그리고 이식 때까지 그 감염묘의 내용물을 그대로 유지하므로 매우 유용하다. 살균 후 가급적 빨리 무균대로 옮겨 자외선 소독을 실시하였다.

<23> 제 2단계: 액체배양한 송이균주 KBFERI 20T05의 감염배지 접종단계

<24> 상기 단계에서 제작 및 고온 살균한 배양용기 내 하단에 자연산 송이버섯 유래의 송이균주 KBFERI 20T05를 골고루 접종한다.

<25> 접종원은 공시 균주나 외형이나 관능에 의한 균주를 사용하지 않고 송이버섯 자실체에서 균주를 분리하고 분자생물학적으로 특정부분의 DNA서열의 상동성이 확인된 균주를 사용해야한다. 따라서, 본 발명은 Gene bank에 등록된 ITS, 5.8S전체 및 18S부분영역대의 서열이 99%이상 상동성을 보인 송이균주 KBFERI 20T05를 Gene bank에 등록한 후 사용하였다. 상기 송이균을 배양하기 위해 PDB배지(Difco사)를 사용하며, 액체배양한 송이균주 KBFERI 20T05의 균사체 덩어리를 하기 표 1의 성분표에 따라 제조된 pH 5.6의 K-액체배지로 수세하면서 살균된 망에 거른 다음, Waring사의 멸균 가능한 분쇄기인 31L91을 사용하여 K-액체배지와 함께 미세한 크기로 분쇄하고 무균대 내에서 상기에서 고온 멸균한 배양용기의 뚜껑을 열고 바닥

부분부터 상기 미세한 송이 균사체를 살균된 10 mL 유리피펫으로 골고루 접종하였다. 상기 분쇄된 균사체들은 균총을 형성하고 층을 이루면서 고루 성장하여 소나무 세균과 송이균의 접촉성을 증가시켰다. 이때 분쇄기로 아주 미세하게 균사체 덩어리를 분쇄하여야 하며 분쇄기에서 발생하는 열은 송이균의 성장을 저해하므로 이를 상쇄하기 위해 K-액체배지는 냉장고에 보관하였다가 5℃ 이하의 온도에서 송이균과 함께 분쇄하여야 한다. 접종량은 K-액체배지 5 mL당 건조중량 0.050 ~ 0.100 mg 정도로 접종하였다. 건조중량의 계산은 거름종이에 5 mL의 접종원을 거르고 24시간 건조한 후 처음 거름종이 무게를 감하고 20회 평균으로 접종량을 구했다. 접종량은 송이균과 소나무 세균의 접촉성에 가장 큰 영향을 미치며 접종량이 많을수록 접촉성도 증가하지만 송이균의 특성적 생장이 빠르지 않음을 고려해 볼 때 상기의 접종량이 적당하다고 판단된다.

- <26> 한편, 송이균의 생체량을 높이고 소나무 세균과의 접촉성을 높이기 위해 배양용기 내 바닥 면에 pH 5.5 ~ 5.6의 K-고체배지를 첨가할 수 있다.
- <27> K-고체배지의 성분 표는 표 1에 기재되어 있으며, pH는 5.5 ~ 5.6으로 고정하는데, 일반적으로 식물의 기내배양 시 최적 pH는 5.7 ~ 5.8 정도이고 송이균의 최적배양 pH는 5.4정도이므로 두 가지 생물의 공동배양에 적합하도록 K-고체배지의 pH를 5.5 ~ 5.6으로 하였다. 또한, 일반적으로 송이균을 액체 배양할 경우 생산량이 저조하므로 송이균의 성장을 높이기 위해서 배양용기 내 가장 하위 층에 위치하는 K-고체배지의 탄소 원의 함량을 높여 짧은 시간동안 송이균의 생체량을 높이고 소나무 세균과의 접촉성을 높였다. 단시간 내에 송이균의 생체량은 높이되 그 분

주량은 최소로 하여 고체배지 내 탄소 원을 완전히 소모할 수 있도록 하기 위해 K-고체 배지의 분주량은 2 cm이하로 하였으며, 바람직하게는 0.5 mm가 적당하다. 이때, 너무 많은 양의 K-고체배지를 분주할 경우 송이균이 높은 탄소 원만을 이용하게 되어 자발적인 소나무 세균 내로의 침입이 이루어지지 않고 균막을 형성하지 않는다.

<28> 【표 1】

K-감염배지의 성분표

배지성분	함량(g/L)
NH_4NO_3	1.65
KNO_3	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002
KCl	0.02
KH_2PO_4	0.2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.9
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.2
$\text{NH}_4\text{-Tar}$	0.5
Fe-Cit	0.5ml(1%)
H_3BO_3	0.031
$\text{MnSO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01516
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0086
KI	0.00083
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00025
Thiamine HCl	100 μg
맥아추출물(Malt-extract)	1.0
효모추출물(Yeast-extract)	0.5
카제인(Casein)	0.3
포도당(Glucose)	3.0
	(단 하층의 고체배지시 10.0)
피타겔(Phytigel)	고체배지의 경우 2.0 액체배지의 경우 제외

<29> 제 3단계: 감염배지의 혼합상토 구성 및 K-액체배지의 첨가

- <30> 소나무 유묘를 배양하기 위해, 상기 단계에서 송이균주가 접종되어 있는 여과지 위로 펄라이트와 스페그넘 피트모스의 혼합상토를 붓고 소나무 유묘의 건조를 막기 위해 K-액체배지 배양액을 붓는다.
- <31> 감염배지에 사용된 상토로 펄라이트, 스페그넘 피트모스를 80 : 1 ~ 2 비율로 섞는데 펄라이트는 일반적으로 상토용으로 많이 쓰이며, 다른 유기물이나 무기물이 거의 존재하지 않으므로 배양 시 K-고체배지나 액체배지의 첨가에 적당하며 스페그넘 피트모스는 보습을 위해 사용하였다. 특히 스페그넘 피트모스의 양을 아주 미량 혼합하는데 이는 강산성을 띠기 때문이다. 배양용기 내에 종이컵이 밀착된 배양용기의 경우, 상기 혼합상토를 다른 용기에서 살균한 후 무균대에서 상기 단계에서 송이균주가 접종된 배양용기에 종이컵과 같은 높이까지 혼합된 상토를 부어 K-액체배지를 첨가하여도 종이컵외부와 배양용기 내에 스며들지 않도록 하였다.
- <32> 한편, 표 1의 배지성분 표에 의해 제조된 K-액체배지를 121℃, 20분간, 1.2기압 하에서 살균하고 이를 냉각한 후 K-액체배지를 무균대 내에서 각 용기 당 100 mL씩 혼합상토 첨가배지에 붓는다. 액체배지를 약간 많이 첨가함으로써 배양 전 기간동안 건조를 방지할 수 있고, 소나무 유묘 생장 시 건조를 막을 수 있다.
- <33> 제 4단계: 무균의 소나무 발아묘 유도 및 감염배지에 치상하는 단계
- <34> 소나무 종자에서 무균 발아된 소나무 발아묘를 뿌리부분은 밑으로 자엽 부분은 위로 향하게 하여 상기 제 3단계에서 제조된 혼합상토와 K-액체배지를 포함한 감염배지에 선택 치상하고 상기 배양용기의 뚜껑을 닫는다.

<35> 한편, 소나무 발아묘를 얻기 위해서, 소나무 종자를 70% 에탄올로 10 ~ 60초간 침지한 후 0.5 ~ 3%의 차염소산나트륨(최적 2%)에 1 ~ 7분간 멸균한 후 멸균수에 3 ~ 4 차례 수세함으로써 식물체를 살균하였다. 이때 차염소산나트륨의 살균시간이 길면 발아율이 떨어지며, 적절한 차염소산나트륨의 살균시간은 5분 정도이다. 멸균 종자를 무균 상태를 유지한 채로 종피를 벗기고 뉴트리언트 브로스(Nutrient Broth, Scharlau사 제품)에 아가(Agar)를 8g/L 을 첨가한 후 무균의 일회용 페트리디쉬에 분주한 후 굳히고 상기 발아배지에 치상하여 15 ~ 28℃ (최적온도: 23 ~ 26℃, 일반적 종자발아온도는 24℃)에서 발아시켰다. 발아된 종자는 다른 미생물에 오염되지 않는 것만을 선택하고 유묘의 길이가 3 cm이하인 것을 취하는데, 3 cm이상인 종자는 배양 시 쓰러지거나 건조하는 현상을 보였다. 상기 유묘를 상기 제 4단계의 송이균이 접종된 감염배지 배양용기 내에 치상하는데, 치상 시는 뿌리부분을 밑으로 자엽 부분을 위로 향하게 혼합상토에 2 cm 정도의 깊게 심고 자엽 부분의 지면 노출은 1 cm이하로 하였다.

<36> 제 5단계: 감염묘 형성을 위한 배양단계

<37> 소나무 유묘의 세근에 송이균사가 감염된 감염묘를 형성하기 위해, 상기 단계에서 제조된 배양체를 15 ~ 25℃, 24시간 10 ~ 40,000 lux 의 광 조건 하에서 배양한다.

<38> 일반적인 감염 배양온도는 15 ~ 25℃ 이며 본 발명은 적정온도로써 20℃를 사용하였는데 이는 식물체로의 유전자 삽입 시 벡터로 작용하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 식물체 감염 시 적정온도로 밝혀진 20℃를 적용한 것이며, 가장 중요한 광 조건은 10~40,000 lux로써 야외에서 자연광은 20,000 lux 정도이나 인위적으로 20,000 lux 이상 유지한다는 것은 배양용기의 투과성 저해, 조명장치의 과열의 문제 등 현실적으로 불가능하므로 자연광과 가장 유사한 삼파장 형광등

을 사용하였으며, 이 형광등을 4기 이상을 부착시킨 배양상에서 배양하고 배양용기내의 조도가 24시간 8,000 lux 이상으로 식물체 탄소 원의 생성을 계속적으로 유지하도록 하였다. 이로 인해 탄소 원이 부족한 송이균이 탄소 원의 획득을 위해 감염 메커니즘을 자발적으로 유도하도록 한 것이다.

<39> 제 6단계: 감염묘 형성의 확인단계

<40> 상기 소나무 유묘와 송이균주를 공동 배양한 후, 감염묘의 세균의 균근의 향취를 조사하고, 실체현미경과 광학, 형광현미경 및 전자현미경하에서 소나무 유묘의 세균의 조직 내로 침입한 균사의 상태를 검경한다.

<41> 상기 배양 후 70일 이내에 감염을 확인할 수 있었는데, 배양중인 감염묘 세균의 균근은 송이버섯의 향과 일치하는 향을 풍겼고, 실체현미경에서 균막 형성을 확인하였으며, 광학, 형광현미경 및 전자현미경상에서 세균의 조직 내로 침입한 균사의 상태를 검경 할 수 있었다. 감염된 균근의 일부를 무균적으로 적출하여 MMN(Modified Melin-Norkron's)배지에 치상하여 배양한 결과 배양배지 내 균사 생장의 형태적인 모양이 송이균과 동일하였으며, 송이버섯 향과 일치하였다.

<42> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<43> 실시예

<44> 실시예 1 : 팽이버섯 배양용기를 이용한 소나무 송이균 감염묘의 배양

- <45> 본 발명의 소나무 송이균 감염묘를 얻기 위해, 투명한 팽이버섯 배양병에 도 4에 나타난 바와 같이, 멸균된 배양용기 내에 멸균된 K-고체배지를 붓고 굳힌 다음 여과지로 덮고 액체배양한 송이균주 KBFERI 20T05 자실체를 멸균수 5 mL 당 건조중량 0.075 mg 정도를 상기 여과지위에 접종하고, 그 위에 펄라이트와 스페그넘 피트모스를 80 : 1.5 비율로 섞은 혼합상토를 첨가하고 pH 5.6의 K-액체배지를 분주하여 감염배지를 제조한 다음, 소나무 종자에 무균 발아시킨 발아묘를 상기 혼합상토와 K-액체배지를 포함한 감염배지에 치상하여 뚜껑을 닫고, 상기 소나무 유묘와 송이균주를 20℃, 24시간 25,000 lux의 광 조건하에서 공동 배양하였다. 상기 배양체를 공동 배양한 후, 감염묘 세균의 균근의 향취를 조사하고, 실체현미경과 광학, 형광현미경 및 전자현미경하에서 소나무 유묘의 세균의 조직 내로 침입한 균사의 상태를 검경하였다.
- <46> 이때, K-고체배지의 두께는 5.0 mm이하로 하며, 여과지는 ADVANTEC사의 NO5B를 사용하였으며, 혼합상토의 두께는 5 cm이하로 하였다.
- <47> 또한, 감염배지를 포함한 배양용기의 외부를 기질배지의 높이까지 알루미늄 호일로 감싸서 빛의 침투를 제거하여 송이균 및 소나무 세균의 생장을 보호하였다.
- <48> 소나무 유묘와 송이균주를 팽이버섯 배양용기 내에서 공동 배양한 결과, 배양중인 감염묘 세균의 균근은 향이 송이버섯의 향과 일치하였으며, 실체현미경하에서 균막 형성을 확인하였고, 광학, 형광 및 전자현미경상에서 세균의 조직 내로 침입한 균사의 상태를 검경할 수 있었으며, 최초 배양 후 70일 이내에 감염이 확인되었다. 감염된 균근의 일부를 무균적으로 적출하여 MMN(Modified Melin-Norkron's)배지에 치상하여 배양한 결과 배양 배지 내 균사 생장의 형태적인 모양이 송이균과 동일하였으며, 송이버섯 향과 일치하였다(미 도시됨).

<49> 제조예 1 : 감염배지 접종을 위한 액체배양 송이균주의 제조

<50> 본 발명에 사용된 송이균주는 자연산 송이버섯에서 분리한 균주를 사용하였으며, 경주시 남산동 소재 도유림 10ha에서 채취한 갓이 퍼지기 직전의 송이버섯을 사용하였다. 상기 송이버섯을 채취한 직후 8시간 내에 갓 부분과 주름부분의 연결부 조직을 0.5mm³ 정도의 크기로 절편을 내어 표 2의 성분 표에 따라 제조된 pH 5.5의 MMN 배지에 치상하고 분리된 균사체를 PDA 배지에서 송이균사분리의 최적온도인 23℃±0.5에서 60일 동안 계속 배양하였다. 상기의 배양 후 대략 98% 정도의 송이균주 분리율을 나타내었다. 본 발명자는 상기에서 분리된 송이균주가 Gene bank에 등록된 ITS, 5.8S전체 및 18S부분영역대의 서열과 99%이상 상동성을 보임을 확인하고 상기 rDNA 서열을 Gene bank에 2001년 4월 3일자로 등록하여 등록번호 AF367417을 받았다. 본 발명자는 상기 송이균주를 임의로 KBFERI 20T05로 명명하였으나 자연산 송이버섯에서 분리한 송이균주 중 rDNA 서열의 ITS, 5.8S전체 및 18S부분영역대의 서열과 99%이상의 상동성을 보이는 어떠한 송이균주라도 본 발명의 소나무 송이균 감염묘 형성을 위해 사용 가능하다.

<51> 본 발명의 소나무 송이균 감염묘를 얻기 위한 접종 원으로써 상기에서 얻은 자연산 송이버섯의 자실체에서 분리된 송이균주 KBFERI 20T05를 PDB 배지(PDA 배지에서 아가를 제외)에서 액체배양한 후 균사체 덩어리를 사용하며, 상기 송이버섯 자실체를 무균적으로 pH 5.0의 멸균수로 수세하였다. Waring사의 멸균 가능한 분쇄기인 31L91을 사용하여 멸균수를 넣고 미세한 크기로 분쇄하여 미세한 송이 균사체를 감염배지의 여과지상에 10 mL-유리피펫으로 골고루 접종하여 접종균이 균총을 형성하도록 하였다. 송이균의 접종량은 멸균수 5 mL당 건조중량 0.075 mg정도로 접종하였다.

<52> 【표 2】

송이균의 분리에 이용된 배지종류와 각 성분(g/l)

배지종류	MMN	PDA	비고
배지조성			
맥아추출물	3.0		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.25		
KH ₂ PO ₄	0.5		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.15		
CaCl ₂	0.05		
FeCl ₃	1.2		
NaCl	0.025		
포도당	10.0		
Potato dextrose B.		24.0	
Thiamine·HCl	0.1		여과하여 사용
pH	5.5	5.5	
아가(Agar)	15.0	15.0	
총 부피: 1L, 종류수로 채움			

<53> 제조예 2 : 소나무 종자에서 무균 발아묘 형성

<54> 상기 소나무 유묘는 소나무 종자를 70% 에탄올로 60초간 침지한 후 2%의 차염소산 나트륨에 4분간 멸균하고 10분간 멸균수에 3 차례 수세하였다. 상기 멸균된 종자는 무균 상태를 유지한 채로 종피를 벗기고 멸균된 뉴트리언트 브로스(Nutrient Broth, Scharlau사 제품)에 아가(agar) 8g/L 을 첨가한 후 무균의 일회용 페트리디쉬에 분주하여 굳히고 상기 발아배지에 치상하여 24℃ 에서 발아를 유도하였다. 다른 미생물에 오염되지 않은 발아묘 만을 선택하여 길이가 3 cm 이하인 것을 취하여 송이균이 접종된 감염배지 용기 내에 치상하였다

<55> 도 2에 나타난 바와 같이, 소나무 유묘는 다른 미생물에 오염되지 않은 발아묘 만을 선택하여 송이균이 접종된 감염배지 내 기질배지에 치상하였다.

<56> 제조예 3 : 감염배지 내 혼합상토 및 K-액체배지의 제조

- <57> 본 발명의 소나무 유묘를 배양하기 위해 사용하는 상토는 펄라이트와 스페그넘 피트모스를 80 : 1.5 비율로 섞은 것을 사용하며, 다른 용기에서 살균한 후 무균대에서 송이 균주가 접종된 배양용기 내 종이컵과 같은 높이까지 혼합상토를 부었다.
- <58> 표 1에 기재된 구성성분 표에 따라 제조된 K-액체배지를 고온 살균하고 이를 냉각한 후 K-액체배지를 무균대 내에서 각 용기 당 100 mL씩 혼합상토에 부었다.
- <59> 실시예 2 : 종이컵을 포함한 배양용기를 이용한 소나무 송이균 감염묘의 형성
- <60> 본 발명의 소나무 송이균 감염묘를 얻기 위해 하기 제조예 1에 따라 제작된 종이컵을 포함한 배양용기 내에 실시예 1의 제조예 1에 의해 제조된 송이균주 KBFERI 20T05의 자실체를 멸균수 5 mL 당 0.075 mg 정도로 하여 살균된 10 mL-유리피펫을 사용하여 종이컵의 밑바닥부분에 골고루 접종하고, 그 위에 상기 실시예 1의 제조예 3에 따라 제조된 혼합상토와 각 용기 당 100 mL의 K-액체배지를 붓고 실시예 1의 제조예 2의 방법을 통해 얻은 소나무 무균 발아묘를 치상한 상기 배양용기의 뚜껑을 닫고, 상기 소나무 유묘와 송이균주를 20℃, 24시간 25,000 lux의 삼파장 형광등을 4기 이상을 부착시킨 배양상에서 공동 배양하였다. 상기 배양체를 공동 배양한 후, 감염묘 세균의 균근의 향취를 조사하고, 실체현미경과 광학, 형광현미경 및 전자현미경하에서 소나무 유묘의 세균의 조직 내로 침입한 균사의 상태를 검경하였다.
- <61> 소나무 유묘와 송이균주를 팽이버섯 배양용기 내에서 공동 배양한 결과, 배양중인 감염묘 세균의 균근은 향이 송이버섯의 향과 일치하였으며, 실체현미경하에서 균막 형성을 확인하였고, 광학, 형광 및 전자현미경상에서 세균의 조직 내로 침입한 균사의 상태

를 검경할 수 있었으며, 최초 배양 후 70일 이내에 감염이 확인되었다. 감염된 균근의 일부를 무균적으로 적출하여 MMN(Modified Melin-Norkron's)배지에 치상하여 배양한 결과 배양 배지 내 균사 생장의 형태적인 모양이 송이균과 동일하였으며, 송이버섯 향과 일치하였다(미 도시됨).

<62> 한편, 상기의 송이 균사체를 종이컵의 밑바닥부분에 접종하면 균총이 종이컵 내 쪽 밑면에서부터 층을 이루면서 고루 성장하여 소나무 세균과 송이균의 접촉성을 증가시킨다.

<63> 제조예 1 : 배양용기의 제작 및 살균

<64> 본 발명의 소나무 송이균 감염묘를 얻기 위해, 소나무 유묘와 송이균의 공동배양을 위한 배양용기를 제작함에 있어, 하단은 시중에 판매하는 소주컵 크기의 종이컵을 배양용기에 밀착하여 끼워 넣고 상단은 종이컵이 없는 투명한 빈 뚜껑을 덮어 도 3의 형태로 배양용기를 제작하여 121℃, 20분간, 1.2기압 하에서 고온 살균하였다. 상기 배양용기를 살균한 후 무균대로 옮겨 자외선 소독을 실시하였다.

<65> 실시예 3 : K-고체배지를 포함한 배양용기 내 송이생산지토양을 상토로 이용한 소나무 송이균 감염묘의 형성

<66> 본 발명의 소나무 송이균 감염묘를 얻기 위해 하기 제조예 1의 방법에 따라 제조된 K-고체배지를 포함한 배양용기 내에 실시예 1의 제조예 1에 의해 제조된 송이균주 KBFERI 20T05의 자실체를 멸균수 5 mL 당 0.075 mg 정도로 하여 살균된 10 mL-유리피펫을 사용하여 종이컵의 밑바닥부분에 골고루 접종하고, 그 위에 하기 제조예 2의 방법으로 제조된 송이생산지토양과 각 용기 당 50 mL의 K-액체배지를 붓고 실시예 1의 제조예

2의 방법을 통해 얻은 소나무 무균 발아묘를 치상한 다음 상기 배양용기의 뚜껑을 닫고, 상기 소나무 유묘와 송이균주를 20℃, 24시간 25,000 lux의 삼파장 형광등을 4기 이상을 부착시킨 배양상에서 공동 배양하였다. 상기 배양체를 공동 배양한 후, 감염묘 세균의 균근의 향취를 조사하고, 실체현미경과 광학, 형광현미경 및 전자현미경하에서 소나무 유묘의 세균의 조직 내로 침입한 균사의 상태를 검경하였다.

<67> 소나무 유묘와 송이균주를 팽이버섯 배양용기 내에서 공동 배양한 결과, 배양중인 감염묘 세균의 균근은 향이 송이버섯의 향과 일치하였으며, 실체현미경하에서 균막 형성을 확인하였고, 광학, 형광 및 전자현미경상에서 세균의 조직 내로 침입한 균사의 상태를 검경할 수 있었으며, 최초 배양 후 70일 이내에 감염이 확인되었다. 감염된 균근의 일부를 무균적으로 적출하여 MMN(Modified Melin-Norkron's)배지에 치상하여 배양한 결과, 배양 배지 내 균사 생장의 형태적인 모양이 송이균과 동일하였으며, 송이버섯 향과 일치하였다(미 도시됨).

<68> 제조예 1 : K-고체배지를 포함한 배양용기의 제작 및 살균

<69> 본 발명의 소나무 유묘와 송이균의 공동배양을 위한 배양용기를 제작함에 있어, 하단은 시중에 판매하는 종이컵(소주컵)을 배양용기에 밀착하여 끼워 넣고 상단은 종이컵이 없는 투명한 빈 뚜껑을 덮어 도 3의 형태로 배양용기를 제작하여 121℃, 20분간, 1.2 기압 하에서 고온 살균하였다. 상기 배양용기를 살균한 후 무균대로 옮겨 자외선 소독을 실시하였다. 상기 살균 배양용기에 pH 5.6인 표 1의 구성성분 표에 따라 제조된 K-고체배지를 무균대 내에서 분주하여 굳히며, 분주량은 2 cm 이하로 분주하며, 바람직하게는 0.5 mm 정도로 분주하였다.

<70> 제조예 2 : 감염배지내 송이생산지토양과 K-액체배지의 제조

<71> 본 발명의 소나무 유묘를 배양하기 위해 사용하는 상토는 송이생산지의 토양을 세 가지의 층(지피층, 가는 마사층, 굵은 마사층)으로 나누어 분리하여 첨가하였는데, 이 세 가지의 층을 야외의 토양 구성과 같이 순서대로 가장 밑면에는 K-고체배지, 굵은 마사층, 가는 마사층, 지피층의 순으로 첨가하였다. 이때, 표 1의 성분 표에 따라 제조된 pH 5.6인 K-액체배지를 121℃, 20분간, 1.2기압 하에서 살균하고 이를 냉각한 후 K-액체배지를 무균대 내에서 각 용기 당 50 mL 씩 첨가하였다.

<72> 실시예 4 : K-고체배지를 포함한 배양용기 내 혼합상토를 이용한 소나무 송이균 감염묘의 형성

<73> 본 발명의 소나무 송이균 감염묘를 얻기 위해 실시예 3의 제조예 1의 방법에 의해 제조된 K-고체배지를 포함한 배양용기 내에 실시예 1의 제조예 1에 의해 제조된 송이균 주 KBFERI 20T05의 자실체를 멸균수 5 mL 당 0.075 mg 정도로 하여 살균된 10 mL-유리피펫을 사용하여 종이컵의 밑바닥부분에 골고루 접종하고, 그 위에 실시예 1의 제조예 3의 방법에 따라 제조된 혼합상토와 각 용기 당 100 mL의 K-액체배지를 붓고 실시예 1의 제조예 2의 방법을 통해 얻은 소나무 무균 발아묘를 치상한 다음 상기 배양용기의 뚜껑을 닫고, 상기 소나무 유묘와 송이균주를 20℃, 24시간 25,000 lux의 삼파장 형광등을 4기 이상을 부착시킨 배양상에서 공동 배양하였다. 상기 배양체를 공동 배양한 후, 감염묘 세균의 균근의 향취를 조사하고, 실체현미경과 광학, 형광현미경 및 전자현미경하에서 소나무 유묘의 세균의 조직 내로 침입한 균사의 상태를 검정하였다.

<74> 상기 소나무 유묘와 송이균주를 공동 배양한 후 감염묘를 조사한 결과, 도 5와 같은 본 발명의 송이 균주가 감염된 소나무 유묘를 나타냈으며, 배양중인 감염묘 세균의 균근은 향이 송이버섯의 향과 일치하였으며, 도 6에 나타난 바와 같이 실체현미경하에서 균막 형성을 확인하였고, 도 7과 도 8의 광학 및 형광현미경상에서 실처럼 보이는 세균의 조직 내로 침입한 균사의 모습이 검경되었고, 최초 배양 후 70일 이내에 감염이 확인되었다.

<75> 감염된 균근의 일부를 무균적으로 적출하여 MMN(Modified Melin-Norkron's)배지에 치상하여 배양한 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 배양 배지 내 균사 생장의 형태적인 모양이 송이균과 동일하였다.

【발명의 효과】

<76> 이상과 같이 본 발명은 실시예를 통하여 설명한 바와 같이, 본 발명은 기내배양을 통해서 무균 소나무 발아묘와 송이균사체를 공동 배양하여 소나무묘목 뿌리에 송이균만을 선택하여 감염시키는 방법을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명은 종래의 송이 균주와 분자생물학적으로 rDNA (ITS영역, 5.8S부분영역, 18S부분영역)부분의 상동성에 근거한 송이균을 사용함으로써 감염체와 감염원의 실체의 객관성을 유지할 수 있는 효과가 있고, 이식 시 종이컵을 분리하여 이식의 작업 편리성 및 송이균의 활착에 비교적 유리한 효과가 있고, 기내배양방법에 의해 연중 감염된 묘목의 대량생산이 가능하므로 기내배양기술산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

PDB 배지에서 액체배양한 송이균주 자실체를 분쇄하여 얻은 균사체 분쇄물을 멸균수 1 mL 당 건조중량 0.010 ~ 0.020 mg으로 하여 살균된 배양용기 바닥에 접종하는 단계;

펠라이트와 스펜그넵 피트모스를 80 : 1 ~ 2의 비율로 섞어 제조한 혼합상토를 상기 송이균주 균사체 분쇄물 위에 붓는 단계;

K-액체배지 총량 1L를 기준으로 하여 NH_4NO_3 1.65 g, KNO_3 0.2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002g, KCl 0.02g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.2g, $\text{NH}_4\text{-Tar}$ 0.5g, Fe-Cit 0.5ml, H_3BO_3 0.031g, $\text{MnSO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01516g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0086g, KI 0.00083g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00025g, Thiamine HCl 100 μg , 맥아추출물 1.0g, 효모추출물 0.5g, 카제인 0.3g 및 포도당 3.0g 의 비율로 첨가하고 나머지는 정제수로 채워 넣어 pH 5.5 ~ 5.6 이 되도록 제조된 K-액체배지를 상기 혼합상토 위에 분주하는 단계;

소나무 종자를 무균 발아하여 얻은 길이가 3 cm 인 무균 발아묘를 상기 혼합상토와 K-액체배지를 포함한 감염배지 위에 치상하고 배양용기의 뚜껑을 닫는 단계; 및,

상기 단계에 의하여 제조된 소나무 유묘와 송이균 배양체를 15 ~ 25℃, 24시간 10 ~ 40,000 lux 의 광 조건 하에서 공동 배양하는 단계를 포함함을 특징으로 하는 송이균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양에 의한 소나무 송이균 감염묘 형성방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 PDB 배지에서 액체배양한 송이균주 자실체를 분쇄하여 얻은 균사체 분쇄물을 살균된 배양용기 바닥에 접종하는 단계 전에 K-고체배지 총량 1L를 기준으로 하여 NH_4NO_3 1.65g, KNO_3 0.2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002g, KCl 0.02g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.2g, $\text{NH}_4\text{-Tar}$ 0.5g, Fe-Cit 0.5ml, H_3BO_3 0.031g, $\text{MnSO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01516g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0086g, KI 0.00083g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00025g, Thiamine HCl 100 μg , 맥아추출물 1.0g, 효모추출물 0.5g, 카제인 0.3g, 포도당 10.0g, 피타겔(Phytigel) 2.0g의 비율로 첨가하고 나머지를 정제수로 채워 pH 5.5 ~ 5.6이 되도록 제조된 K-고체배지를 먼저 도말하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 송이균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양에 의한 소나무 송이균 감염묘 형성방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 배양용기는 그 하단에 종이컵을 밀착하여 끼워 넣은 형태로 제작됨을 특징으로 하는 송이균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양에 의한 소나무 송이균 감염묘 형성방법.

【청구항 4】

제 2항에 있어서, 상기 K-고체배지를 배양용기 하단에 분주함에 있어 분주량은 0.5 ~ 20 mm 으로 분주함을 특징으로 하는 송이균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양에 의한 소나무 송이균 감염묘 형성방법.

【청구항 5】

PDB 배지에서 액체배양한 송이균주 자실체를 분쇄하여 얻은 균사체 분쇄물을 멸균수 1 mL 당 건조중량 0.010 ~ 0.020 mg으로 하여 살균된 배양용기 바닥에 접종하는 단계;

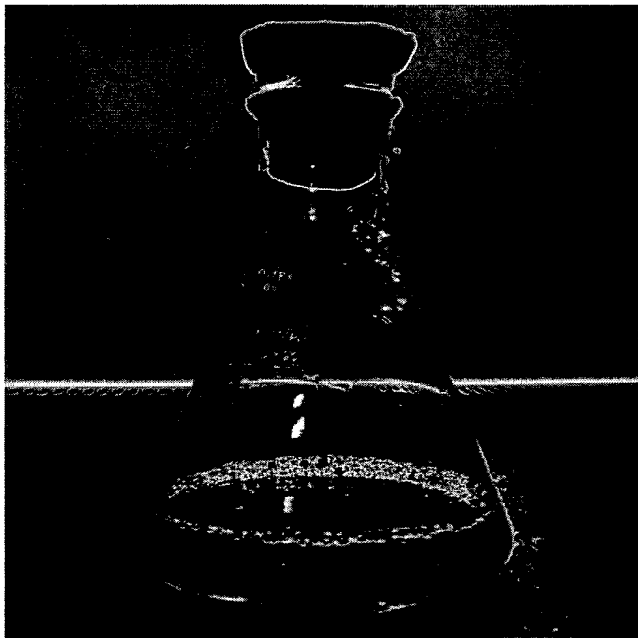
펠라이트와 스펀그넬 피트모스를 80 : 1 ~ 2의 비율로 섞어 제조한 혼합상토를 상기 송이균주 균사체 분쇄물 위에 붓는 단계;

K-액체배지 총량 1L를 기준으로 하여 NH_4NO_3 1.65 g, KNO_3 0.2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002g, KCl 0.02g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.2g, $\text{NH}_4\text{-Tar}$ 0.5g, Fe-Cit 0.5ml, H_3BO_3 0.031g, $\text{MnSO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01516g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0086g, KI 0.00083g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00025g, Thiamine HCl 100 μg , 맥아추출물 1.0g, 효모추출물 0.5g, 카제인 0.3g 및 포도당 3.0g 의 비율로 첨가하고 나머지는 정제수로 채워 넣어 pH 5.5 ~ 5.6 이 되도록 제조된 K-액체배지를 상기 혼합상토 위에 분주하는 단계;

소나무 종자를 무균 발아하여 얻은 길이가 3 cm 인 무균 발아묘를 상기 혼합상토와 K-액체배지를 포함한 감염배지 위에 치상하고 배양용기의 뚜껑을 닫는 단계; 및, 상기 단계에 의하여 제조된 소나무 유묘와 송이균 배양체를 15 ~ 25℃, 24시간 10 ~ 40,000 lux 의 광 조건하에서 공동 배양하여 제조되며 소나무 유묘의 뿌리에 송이균이 감염된 것을 특징으로 하는 소나무 송이균 감염묘.

【도면】

【도 1】



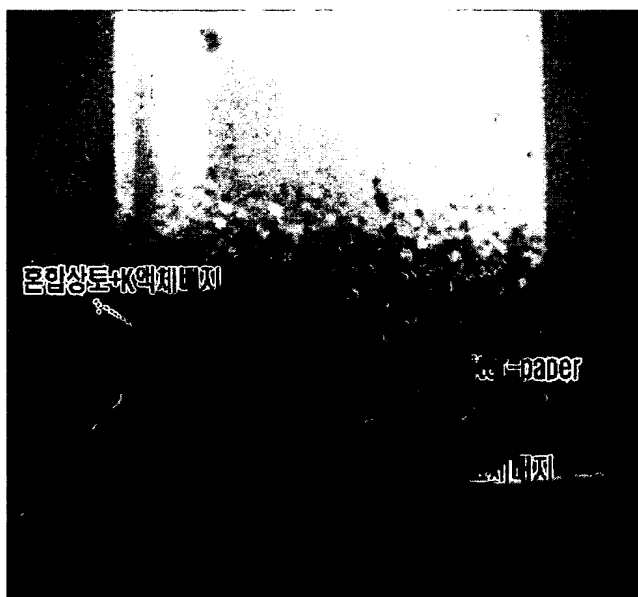
【도 2】



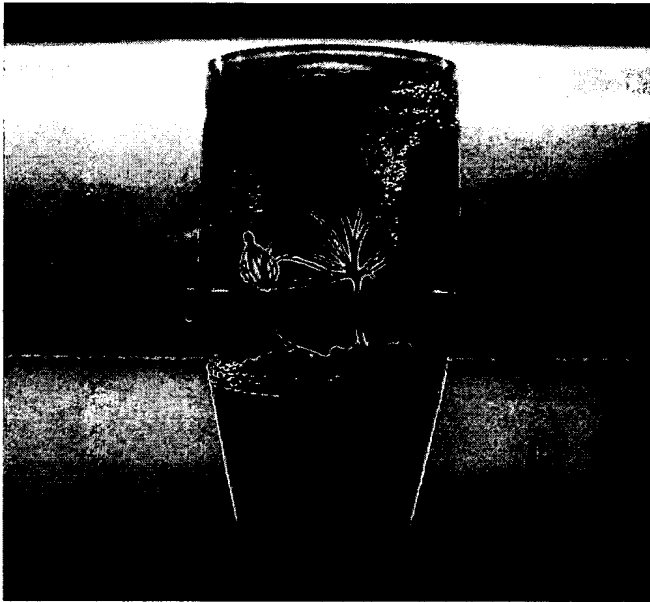
【도 3】



【도 4】



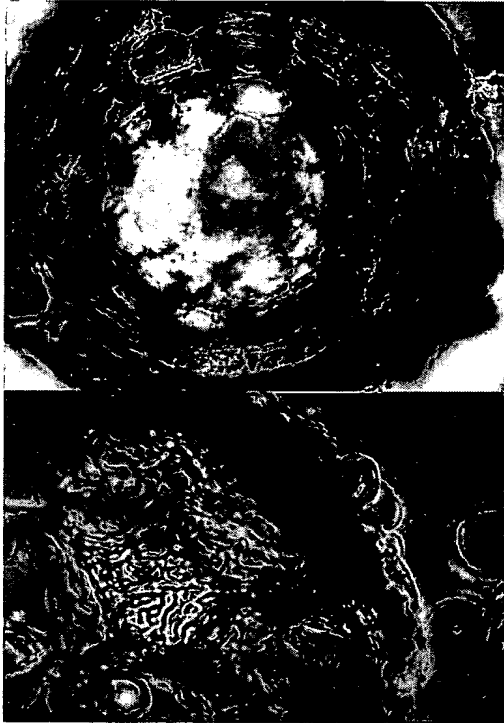
【도 5】



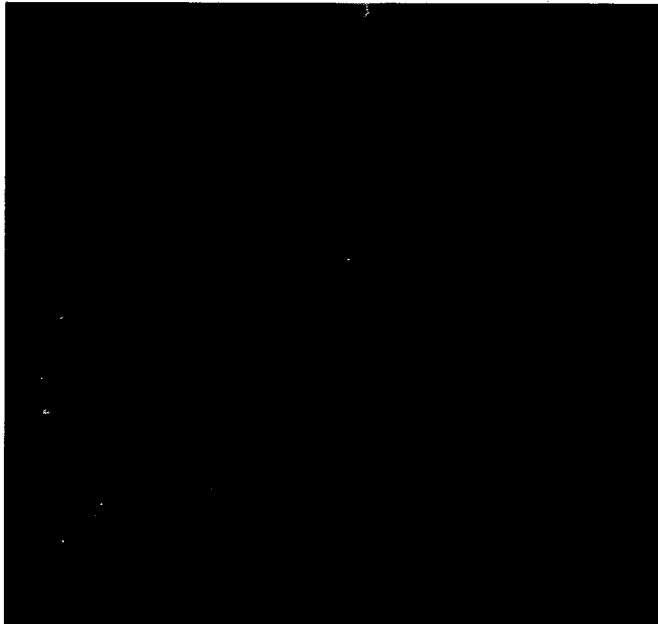
【도 6】



【도 7】



【도 8】



【도 9】

